鱗翅類の染色体について

前　木　孝　道
関西学院大学・理学部生物学教室

The Chromosome of the Lepidoptera

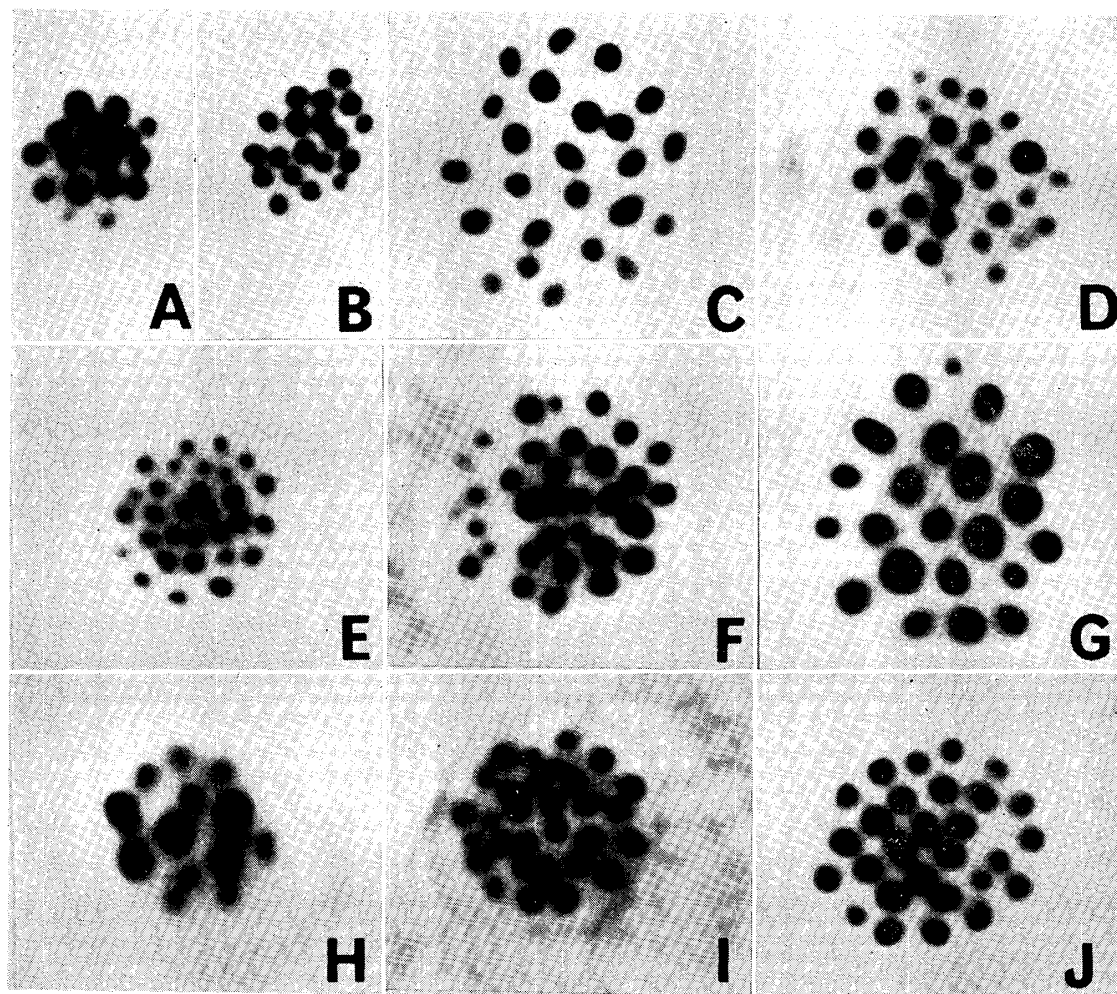
Kodo Maeki

あらゆる生物において，染色体の形態は動原体の位置によって決まる．即ち，染色体の中央部に動原体があると，細胞分裂に際して紡錘糸はこの動原体（紡垂糸付着点）につき，ここから染色体は極の方向へ引っぱられて，V 形の形をとる．また染色体の中央部と端部との中間に動原体が存在すると，紡垂糸はこの動原体に付着して J 形染色体となり，あるいは染色体の末端部に動原体が存在すると，棒状染色体となる．このように染色体の形態は動原体が染色体上のどの位置に存在するかによって決定される．

鱗翅類の染色体は今迄のパラフィン法，或は押しつぶし法でみると，分裂中期の染色体は円い点状染色体として観察される（A図—J図）．この点状にみえる染色体は小さなV形染色体が縮まって点状にみえているのか，或いは小さな J 形又は棒形染色体が固定のために収縮して点状にみえているのか，蝶や蛾の染色体はどのような形態が真の姿であるのか？また一方において，昔から鱗翅類の染色体は diffuse kinetochore を持つ holokinetic chromosome, 即ち動原体が染色体上に一個存在する型ではなくて，多数の動原体が染色体上に散在する型の染色体であると言われて来た．然しながら，これは遺伝学上或は進化学上，そのように考えなければ説明がつかない現象から推測されたもので，細胞学的な実証はなかった．処が最近になって英国の Bigger (1975, 1976) が，*Pieris brassicae* L. 及び *Polyommatus icarus* Rott. を材料として，「体細胞分裂中期で第一次狭窄即ち一個の動原体を総べての染色体が明らかに持っているが，減数分裂においては第一次狭窄をみる事は出来ない．即ち mitosis では鱗翅類の染色体は monokinetic であるが，meiosis においては，holokinetic であるかも知れない」との，あたかも *Ascaris* における卵分割の mitosis と meiosis における染色体の相異のような報告がなされて，世界中の細胞遺伝学者の注目を集めた．

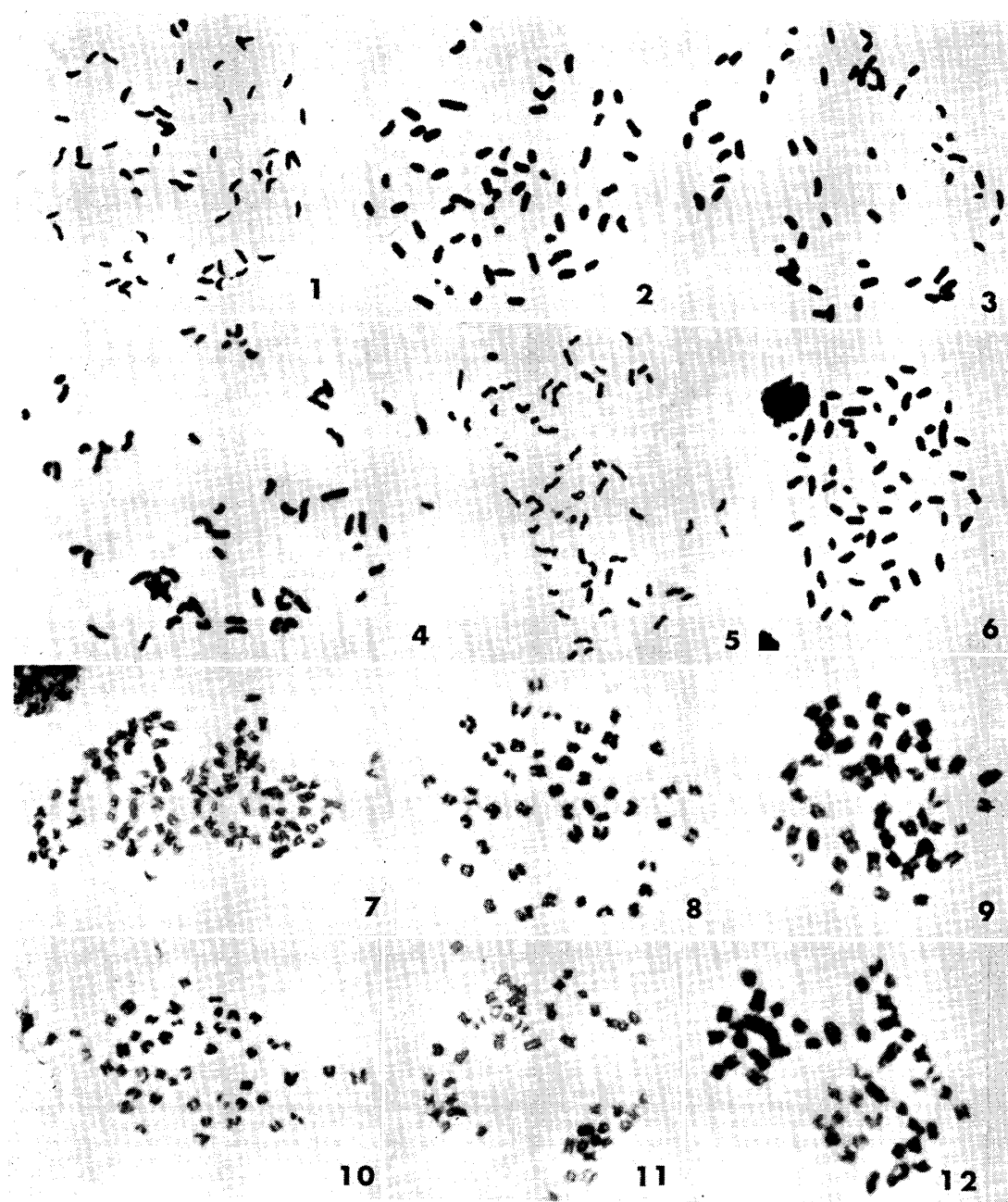
これら鱗翅類の染色体形態に関する問題は，以前からの私の宿題であり，多くの歳月をかけて取り組んできた．

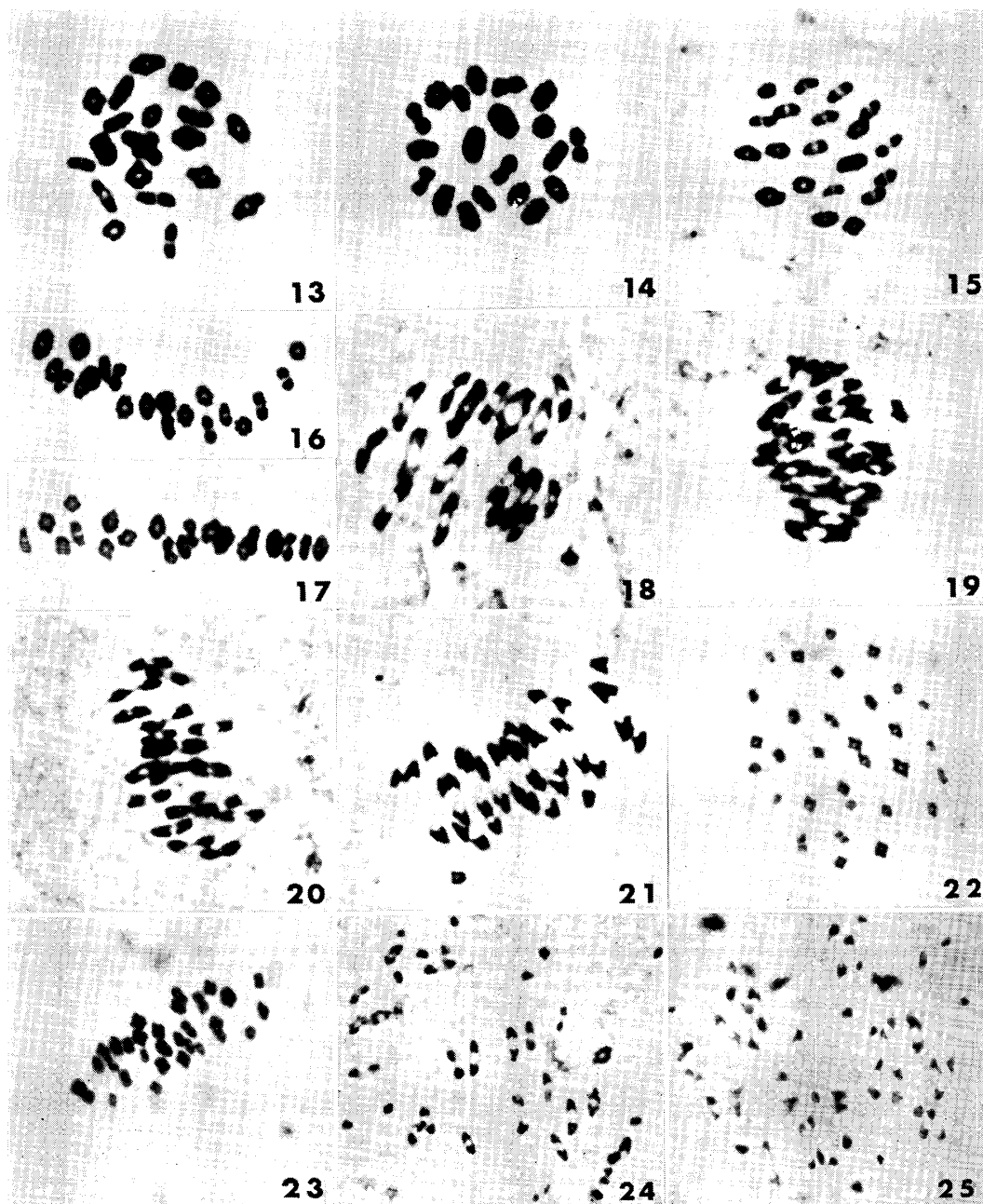
1．体細胞分裂中期及び後期における染色体 (2n) について．

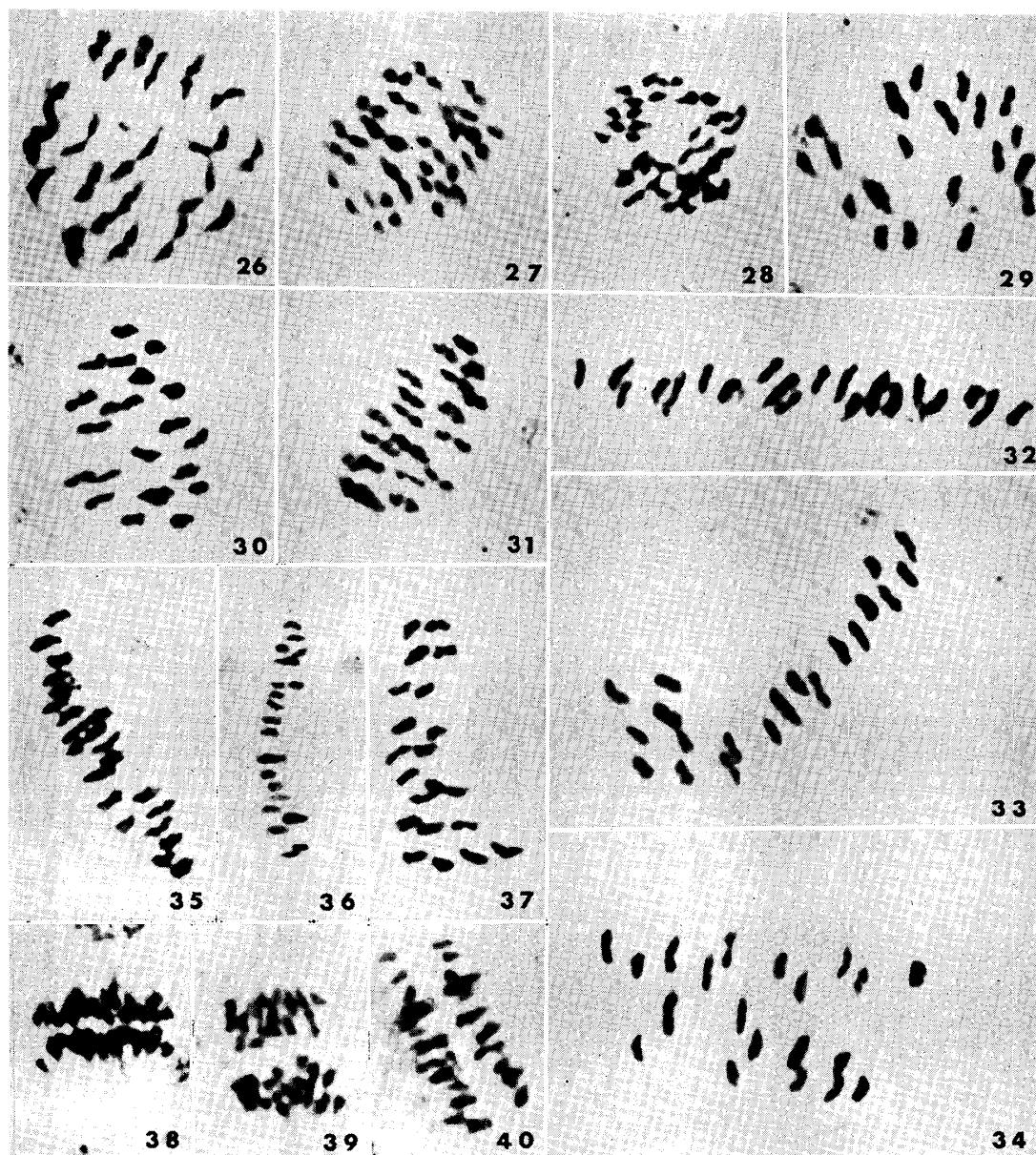
古くから染色体研究において，特に染色体の形を決定する仕事では，体細胞分裂中期 (mitotic metaphase) における染色体について調べその報告がなされている．一般的に，減数第一分裂 (M–I) の染色体はキアズマ (chiasma) を形成していて，その染色体の形態を正確に把握することが困難である．最も材料として良いのは，2n の mitosis の染色体であり，第 1 図から第 6 図に示したのは，空気乾燥法 air-drying method により Giemsa 染色したもので，カラスアゲハ *Papilio bianor*, ミヤマカラスアゲハ *Papilio maackii*, キタテハ *Polygonia c-aureum*, ツマグロヒョウモン *Argyreus hyperbius*, ウラギンシジミ *Curetis acuta* の精原細胞 (2n) の染色体である．*P. bianor* と *P. maackii* については *n*, 30, *P. c-aureum* と *A. hyperbius* は *n*, 31, *C. acuta* については *n*, 29 の報告が著者 (1953, 2961) によってなされている．これら 5 種の核型 (karyotype) からも，V 形あるいは J 形と明らかに確認出

Figs. A–J. Meiotic chromosomes of butterfly. Paraffin-section materials. A: *Polytremis lubricans taiwana* (*n*, 16, M–I). B: *Leptosia nina niobe* (*n*, 19, M–II). C: *Rapala varuna formosana* (*n*, 24, M–I). D: *Timelaea maculata formosana* (*n*, 30, M–I). E: *Tacoraea selenophora laela* (*n*, 30, M–I). F: *Neptis ananta taiwana* (*n*, 33, M–I). G: *Parantica melaneus swinhoei* (*n*, 22, M–I). H: *Radena similis similis* (*n*, 13, M–I). I: *Idea leuconoe clara* (*n*, 30, M–II). J: *Lethe europa pavida* (*n*, 29, M–I).

来る染色体を指摘することは出来なかった．次の7図から 12 図までの写真は分裂後期の初めのもので，染色体は分裂して2本ずつの姉妹染色分体 sister chromatid の形で，それぞれ平行に並んでいる．HUGHES-SCHRADER & SCHRADER (1961) が Hemiptera の *Euschistus* と *Solubea* で holokinetic chromosome の研究をしたが，その染色体が後期で2本の sister chromatid 同志が平行に並んで，それぞれの極へ横向きのままの形で移動する様子と，7図から 12 図にみる蝶の染色体が，極へ向って行動を起す様子とは良く似ている．これも鱗翅類昆虫の染色体が holokinetic chromosome であることを裏付ける一つの材料であると考えられる．

2. 減数第一分裂 (M–I) 及び第二分裂 (M–II) の中期及び後期における染色体の形態と行動について．

材料はアオスジアゲハ *Graphium sarpedon* とオオミノガ *Eumeta variegata* を用いた．アオスジアゲハを用いた理由は，大きな染色体を持ち，かつ染色体数が少い点から観察し易く，最適な材料と考えたからであり，またオオミノガを用いたのは，晩秋及び早春にミノの中で幼虫が meiosis をしてい

Figs. 1–12. 1–6: Spermatogonial metaphase. 7–12: Spermatogonial anaphase. 1: *Papilio bianor* (2*n*, 60). 2, 6: *Curetis acuta* (2*n*, 58). 3: *Papilio maackii* (2*n*, 60). 4: *Polygonia c-aureum* (2*n*, 62). 5: *Argyreus hyperbius* (2*n*, 62). 7 (2 nuclei), 9, 11, 12: *Narathura japonica* (2*n*, 48). 8, 10: *Favonius latifasciatus* (2*n*, 48).

て，普通の蝶や蛾が細胞分裂をしていない時期に材料として用いることが出来る有利さのゆえからである．アオスジアゲハは他のアゲハチョウが *n*, 30 の染色体数を持つのに，この種は *n*, 20 であり，しかも個々の染色体は非常に大きい．但し，meiosis の時期が他の *Papilio* と異って幼虫及び蛹の初期に限られていて，成虫では成熟分裂はみられず，研究材料としての幼虫は卵から育てる必要がある．研究方法は「押しつぶし法」で 2% acetic orcein を用い，位相差顕微鏡で観察し，空気乾燥法は 5% Giemsa 染色をした．A 図から J 図はパラフイン法により得た各種蝶の染色体を示している．鱗翅類の染色体は今迄に調べられた殆んど総べての種で，この点状染色体を持つが，僅かに Lorkovic (1941)

Figs. 13–25. 13–21: *Graphium sarpedon* (*n*, 20). 22–25: *Eumeta variegata* (*n*, 31). 13–17: M–I metaphase (a ring of four). 18–21: M–I anaphase (pseudo-V-shaped chromosome). 22–23: M–I metaphase (a ring of four). 24–25: M–I anaphase (pseudo-V-shaped chromosome). 13, 14, and 16 following air-drying squash method; others by aceto-orcein squash method. ×2000.

によって研究された欧州の *Leptidea sinapsis* において数個の V 形染色体及び棒状染色体が報告されている．また南米の Satyridae 及び Ithomiidae の種の中で V 形及び棒状染色体が de Lesse (1967) によって報告されている．著者により今迄に調査された日本及び世界各地の蝶，約千種のうちただ一種 *Leptidea amurensis* が M–I 及び M–II において，大形な二個の染色体及び小形な 59 個の染色体は共に完全な点状染色体ではなく，多少角ばった形態を持つ染色体であった (前木, 1958)．13 図のように M-1 の中期に近づくと，2 本の相同染色体 homologous chromosome は対合して二価染色体を

Figs. 26–40. *Graphium sarpedon* (*n*, 20). Aceto-orcein squash preparations, ×2000. 26–37: M–II metaphase; two sister chromatids with a tadpole-form taking linear arrangement. 38–40: M–II anaphase; chromosomes showing end-first movement to the pole.

形成するが，この時既に各々の染色体は二本になっていて，合計四本の染色分体 chromatids からなる tetrad の状態にある．この四本の chromatid が端部で接合して環状染色体 ring-chromosome を形成する．即ち a ring of four の形をとる．次に，中期から後期に入ると，この四本の染色分体は二本ずつ両極へ移動するが，その様子は 18 図から 21 図にみるように，あたかも V 形染色体の如くみえるが，これは本当の V 形染色体ではなく，二本の棒状染色体が付着して V 形にみえているだけであり，二本の染色体の付着した末端部は，それぞれ独立した別個の染色体であることを示している．また次に続く減数第二分裂 (M–II) では当然ながら，この V 形の染色体は現れてこない．

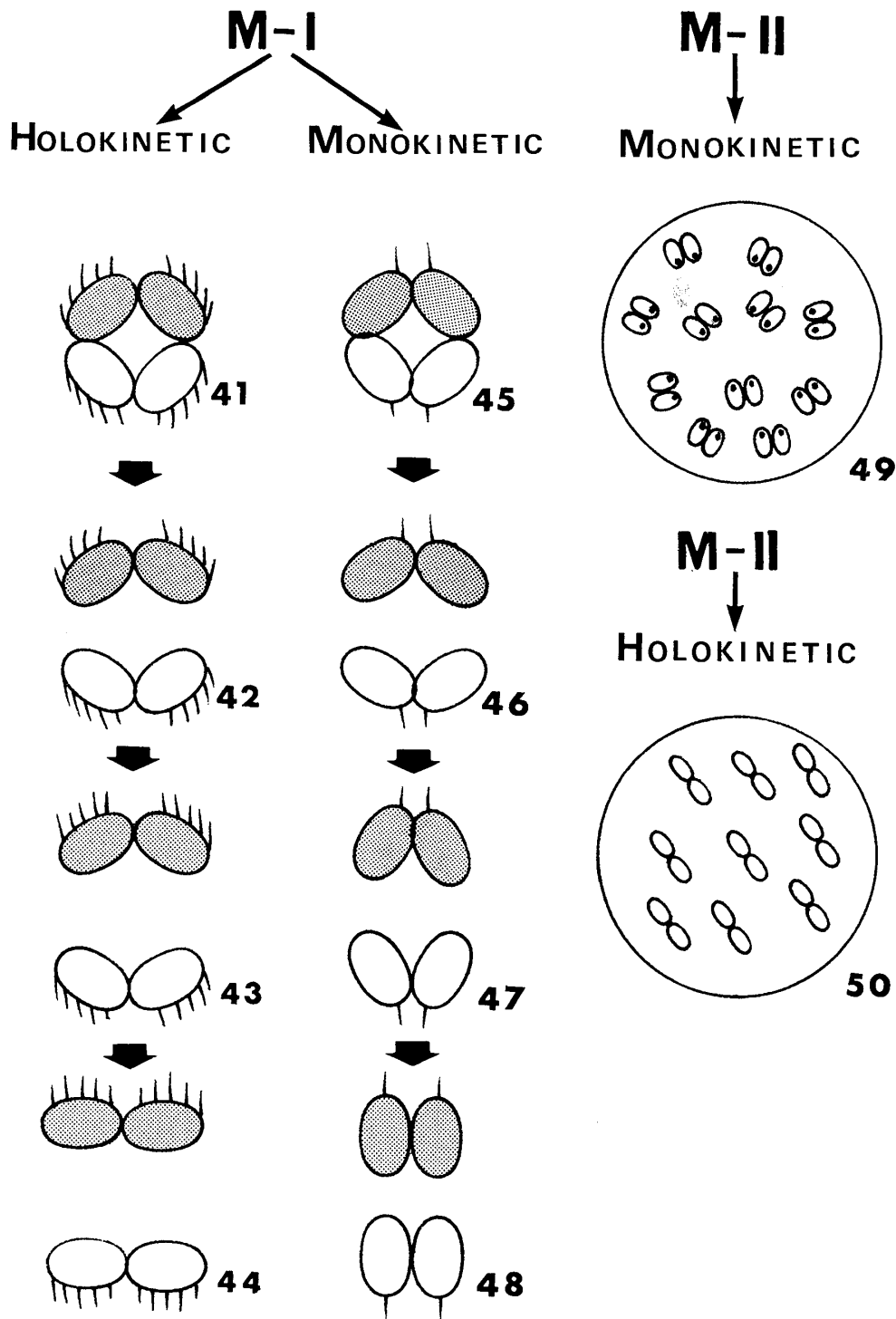
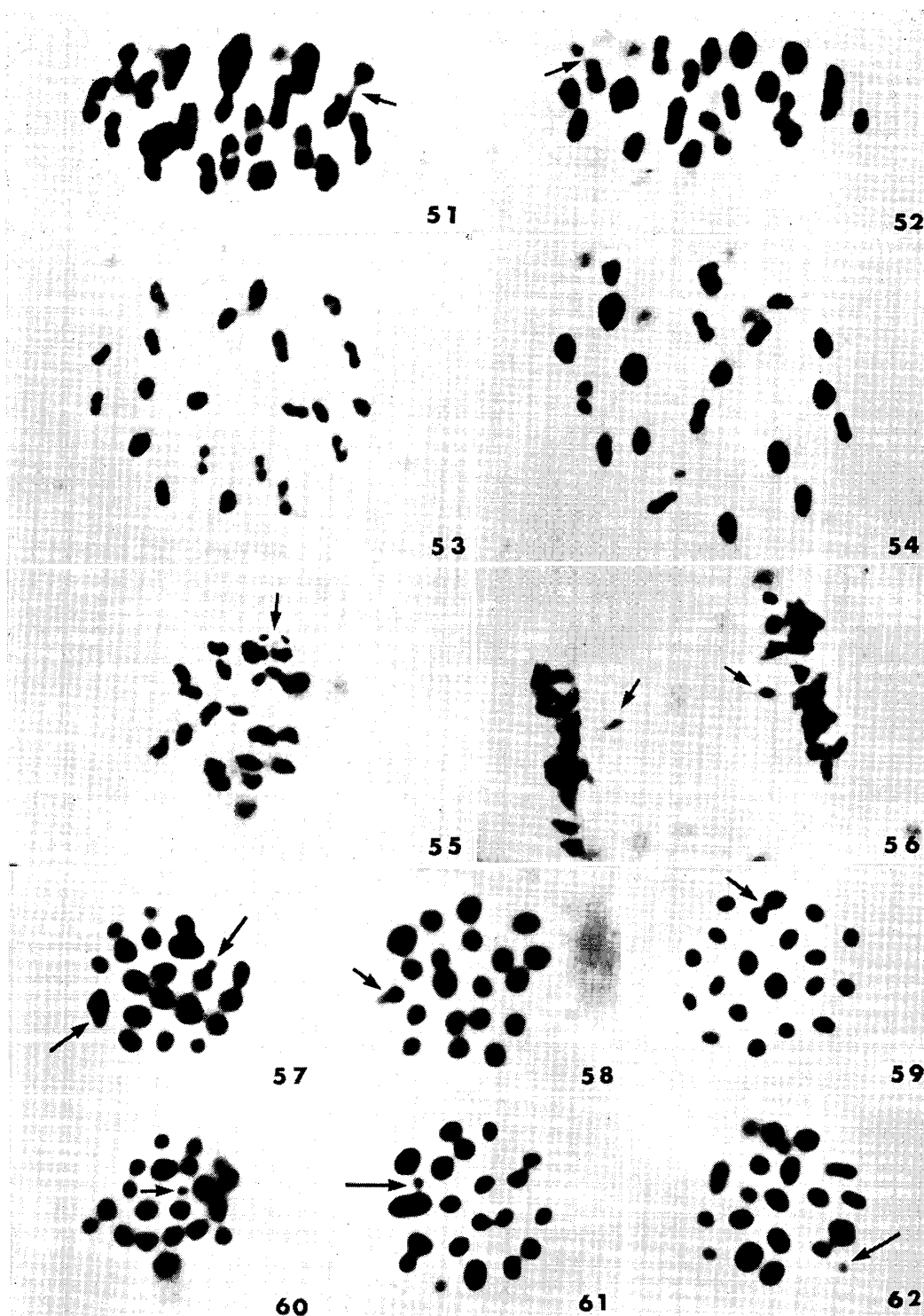
M–I から M–II に移行する染色体の行動は，M–I の中期から後期にかけて，この外観上二本の染色体が付着して V 形にみえている染色体は極に近づくにつれて，V 形の腕に相当する二本の棒状染色

体は次第に左右に開いてきて，水平に直線的な配列をとる．即ち 26 図にみるように端部で接した二本の染色体は直線に近い形をとる．この時，二本の染色体は近接した末端部で染色体は収縮して円味をおび，他端で少し長く伸びた“オタマジャクシ”に似た形をとる．この時，オタマジャクシの尾部に相当する部分は紡垂糸が集って筆の穂先状の様相を呈する．このオタマジャクシ形の染色体は diffuse kinetochore をもつ群である半翅目トコジラミ科 Cimicidae で報告がある (UESHIMA, 1963).

続いて起る第二分裂 (M–II) では第一分裂 (M–I) の末期の染色体が，その染色体の形を崩すことなく，第二分裂中期の染色体として分裂を開始する．換言すれば，第一分裂と第二分裂との間には休止期 resting stage は存在しない．この M–II の中期では M–I の後期で V 形染色体を仮想させたものは，二本の棒状染色体であって，この染色体は一本ずつ極へ移動して M–II の分裂は完了する．以上で，M–I, M–II の分裂経過と各分裂時における染色体の形状を詳細に追跡してきたが，上述の範囲では蝶の染色体が短い棒状染色体である事は理解されても，未だ動原体が染色体の末端部に一個存在する棒状染色体か？ 或は染色体上に動原体が数多く散在する即ち diffuse kinetochore を持つ holokinetic な棒状染色体であるのか？ そのどちらであるかの確証はない．では次に M–I の中期から M–II の中期に進んでいく染色体の行動と，その各時期の染色体形態について考察してみよう．今，仮りに M–I の後期に出現する V 形にみえる染色体 (21 図) が，端部に動原体を一個持つ二本の monokinetic chromosome よりなると仮定すると，この二本の染色体は M–I の中期から後期，末期と進むに従って何故に V 形染色体の両腕のように見えていた二本の染色体は次第に開いてきて直線状に配列するのか (26 図)？ この二本の染色体が端部に動原体を持つ棒状染色体，即ち monokinetic ならば後期から末期に進むに従い，開かずに逆に閉じてきて，二本の棒状染色体は平行にくっついて，動原体の部分を細胞の中心部即ち，極に近い方向に向けて染色体は放射状配列をとる筈である (模式図 49 図)．処が，実際には二本の染色体は開いて各染色体は直線的配列 (模式図 50 図) をとるのは，M–I の中期から後期，末期にかけて染色体が極に近づくにつれて，最初は端部の動原体即ち極に最も近い動原体と極との間の紡垂糸が働いていたが，次第に他の染色体部分に存在する動原体と極との間の紡垂糸が働きはじめ，これら紡垂糸の機能が同調してきて二本の染色体は開いて直線的配列をとるようになると考えられる．或は反対側の染色体末端で chiasma が形成されているため，その部分の染色体が相手側の染色体と離れて自由になるのに時間がかかり，他の染色体部分はそれだけ極へ近づき，全体としてこの二本の染色体は V 形に似た形をとっているが，次第にこの遅れをとり戻して直線状に開いてくるものと思われる (26–37 図)．いずれにしても，M–I の中期から M–II の中期にかけての染色体の形状と行動は，蝶類の染色体が diffuse kinetochore をもった holokinetic chromosome でなければ，説明のつかないものである．

次にオオミノガを材料として，押しつぶし法でその染色体をみてみると，この種は精原細胞で $2n$, 62, meiosis で n, 31 の種であり，M–I ではアオスジアゲハでみられる a ring of four と同様の形を中期でとり，このリングはあたかも菱形のような形で染色体は現れ，後期ではアオスジアゲハと同じく V 形染色体に似た形をとり (22–25 図)，次第に極に近づくにつれて，この二本の染色体は開いて直線的となり，M–II ではこの二本の染色体が一本ずつ離れて極へ移動する．このオオミノガにおける染色体の様子はアオスジアゲハにおけるものと全く同じ形態及び行動をとる．以上の諸点から蛾の仲間も蝶類と同じく holokinetic chromosome を持つものと考えられる．

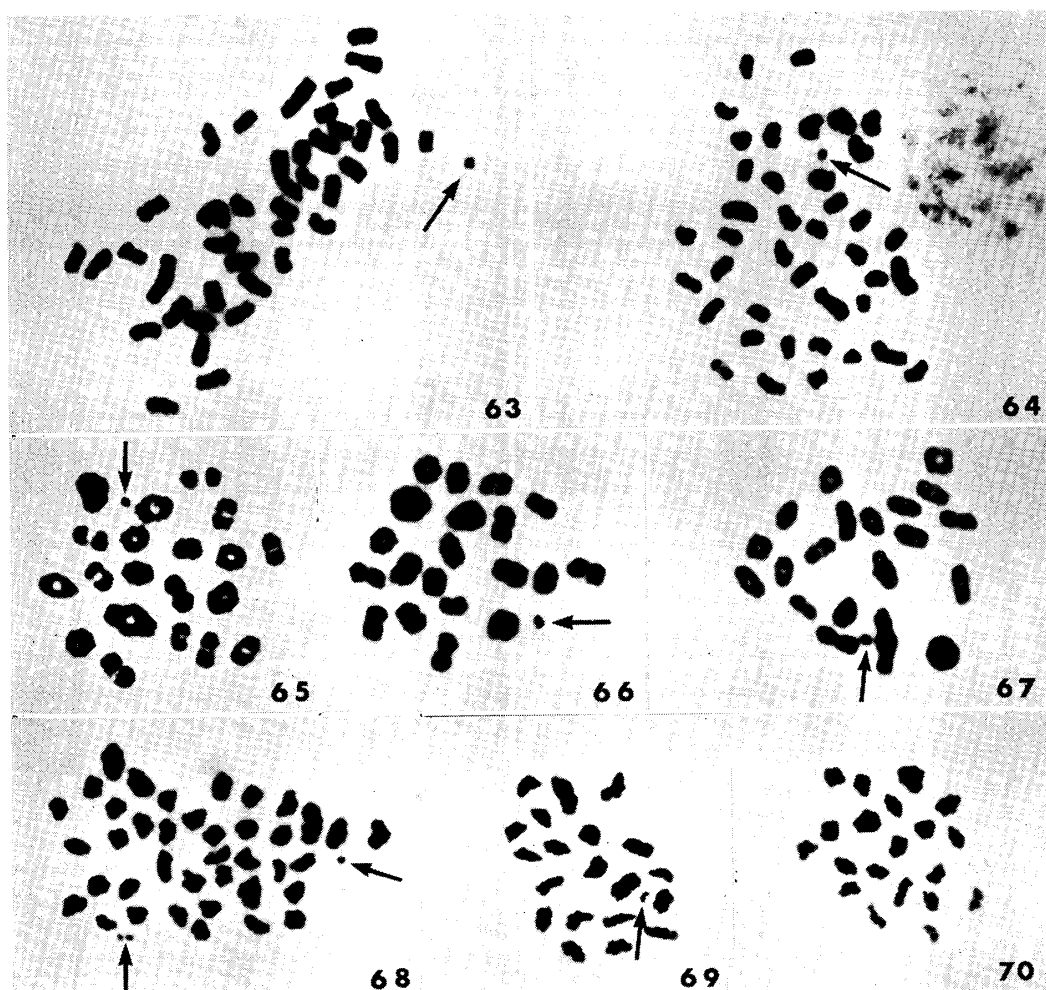
3．^{60}Co 照射実験について．

HUGHES-SCHRADER & SCHRADER (1961) のカイガラムシの実験を真似て，800R から 2000R までを最も meiosis の盛んな時期，即ち終令幼虫 (アオスジアゲハ) に照射して染色体に切断 (fragmentation) を起させて，その断片染色体の行動から diffuse kinetochore を持つ染色体であるか否かを実証しようと試みた．大阪大学，微生物病研究所付属病院，放射線科の島津 ^{60}Co 遠隔治療装置で線源

Figs. 41–50. Diagrams illustrating the morphology of chromosomes during meiotic stages. 41–44: Showing holokinetic chromosomes. 45–48: Showing monokinetic chromosomes. 41, 45: Showing "a ring of four" at M–I metaphase. 42, 43, 46, 47: Showing "pseudo-V-shaped chromosome" at M–I anaphase. 44, 50: Two sister chromatids showing linear arrangement at M–I telophase, and M–II metaphase. 48, 49: Two sister chromatids taking parallel arrangement. All chromatids take radial arrangement with kinetochore directing toward cell center (fig. 49, dot-marks indicate kinetochores in each).

Figs. 51–54:, 57–62. M–I chromosomes of *Graphium sarpedon* (*n*, 20) irradiated by gamma-rays. Figs. 55–56. M–II chromosomes irradiated. 51–56: Aceto-orcein squash materials. 57–62: Paraffin-section materials. 57, 60: 18 hr. post-radiation in 800R. 58, 59: 18 hr. post-radiation in 1500R. 52, 53, 55, 56: 18 hr. post-radiation in 2000R. 61, 62: 24 hr. post-radiation in 2000R. 51: 27 hr. post-radiation in 2000R. 54: 30 hr. post-radiation in 2000R. 51, 52, 57, 58: Elongated chromosomes ready to divide in part (arrows). 53, 54, 60, 61, 62: Normal 20 chromosomes plus one fragment (arrows). 59: 19 elements with a fused chromosome (arrow). 55, 56: Showing two divided fragments (arrows).

から被射体までの距離は 75 cm, 線量率 53.5 R/min, Fild size 12 cm^2 で 800R, 1000R, 1500R, 2000R になるように時間を変えて照射し，照射後 18 時間，21 時間，24 時間，27 時間，30 時間後の各時期の精巣を Allen's P.F.A.-3 液で固定，及び 2% acetic orcein の押しつぶし法で顕微鏡標本を作成し染色体の観察を行った．その結果は 53 図にみるように M–I 細胞において，*n*, 20 であるべき細胞が *n*, 21 の染色体を示し，明らかに切断が起っている事を示している．また 59 図のように *n*, 19 の染色体を持つ細胞がみられ，これは 53 図の場合とは逆に γ 線の照射によって，二個の染色体が融合 (fusion) して数が減少を起すことを示している．また 51 図や 52 図にみる如く，一個の染色体の一部分が細長く伸びて，切断の起る直前の様子を示しているものも存在する．この実験の目的は放射線照射によって，染色体に切断を起させ，その断片が細胞分裂の中期から後期にかけて正常な他の染色体と同様に分裂して，それぞれの極へ移行すれば，この断片染色体が動原体を持っている事の証拠であり，mitosis, meiosis の細胞に拘らず，鱗翅類の染色体が diffuse kinetochore を持つために，この断片染色体も kinetochore を持ち，正常な染色体と同じ行動をとったと結論出来る．たのためには後期の側面観で，この断片染色体の行動を追跡しなければならない．細胞分裂の各時期のうち，この後期が最も時間的に短い時期であり，断片染色体を持った細胞を，その側面観でとらえる事は至難の業である．55 図と 56 図で断片染色体と思われる小さな染色体が分裂している様子を示したが，この二枚の写真が二年間を費した放射線照射実験で得られた貴重な写真である．この事からも分るように，この種の実験は労力を多く費したわりに効果の少い実験であり，一方において照射により染色体が切断を起しても，また直ぐもとの場所か，或は異った場所にくっついてしまう修復の起ることが今迄に報告されており，この種の実験を一段と困難にしている．

4．自然状態で見出された断片染色体の行動について．

アオスジアゲハを材料として空気乾燥法で標本を作っているうちに，一個体に自然状態で生じた断片染色体 (fragment chromosome) を一個持つ個体が見出された．63 図及び 64 図はその個体の 2*n* の細胞 (spermatogonia) であるが，一個の小さな断片染色体が加わって，2*n*, 41 の染色体を持った細胞である．これが M–I 細胞に進むと当然のことながら，すべての M–I 細胞は皆，この断片染色体を持った *n*, 21 である (65–67 図)．更に M–II 細胞に進むと，中期でこの断片染色体を含む核板，即ち *n*, 21 の細胞 (68–69 図) と，断片染色体を含まない核板，即ち *n*, 20 の細胞 (70 図) との両者が現れる．その原因は鱗翅類の meiosis は前還元型 (pre-reduction type) であって，この M–II 細胞の断片染色体は 2*n* の体細胞染色体の切断から由来したもので一価染色体であり，この一価染色体は M–I 細胞の分裂に際して分裂せず，そのままの状態で分裂して生じた二個の M–II 細胞のどちらかへ入っていくこととなる．その結果 M–II 細胞では fragment を持った *n*, 21 と持たない *n*, 20 との二種類の細胞が半数ずつ出現する結果となる．更に 68–69 図にみる如く，M–II 細胞の分裂に際して，この fragment chromosome は確実に分裂する．

上に述べたように，偶然自然状態で見出された，この断片染色体は mitosis 及び meiosis を通じて全く規則正しい染色体としての行動をとっている．この事実から，この fragment chromosome は個体発生の相当に早い時期に切断 (fragmentation) によって生じたと考えられると共に，この fragment chromosome は動原体を持っていなければ，これだけ規則正しい行動をとることは出来ないと考えられる．同時に，2n 細胞における fragment chromosome 以外の 40 個の染色体及び M–I, M–II 細胞の 20 個の染色体も，染色体としての規則正しい行動を示している．即ち染色体の切断により生じた断片染色体が動原体を持っていると共に，切断により断片染色体を生じた残りの染色体の部分も動原体を持っていなければ，ここにみられるような規則正しい行動をすべての染色体がとることは出来ない．以上の考察から蝶類の染色体は holokinetic chromosome であって動原体は染色体上に多数ちらばって存在する型 diffuse kinetochore と確認される．

Figs. 63–70. Showing the fragment chromosomes in mitotic and meiotic nuclei of *Graphium sarpedon*. ×3000. 63–64: Spermatogonial metaphase (*n*, 41). 65–67: M–I chromosomes (*n*, 21). 68–70: M–II chromosomes (*n*, 20 or *n*, 21). Fig. 68: Two nuclei. The fragment chromosome is indicated by arrow.

5. 電子顕微鏡でみると微小管 microtubules(MTs) が染色体に付着する様子はロート状構造 funnel-type structure を示している.

オオミノガ幼虫を材料として，M–I 細胞の紡垂糸が染色体に付着している様子を電顕で観察すると，MTs が染色体に付着する状態は 71 図に矢印で示したように，その基部で少しく膨らんだロート状構造を示している．この様子は *Internatn. Rev. Cytology*, Suppl. 3 (1972) に紹介された Lambert (1971) の *Luzula* (イグサ科，スズメノヤリ) における diffuse kinetochore の電顕写真とよく似ている．*Luzula* における Lambert の研究でも MTs が染色体に付着する所では MTs の基部が funnel-type structure を示している．この電顕像が他の localized kinetochore を持つ染色体において，MTs が染色体に付着する場所で三部構造を示すのと異ってロート状構造を持つ事実も，鱗翅類の染色体が holokinetic chromosome である事を支持する一つの材料であると思われる.

6. 蝶類の多くの種にみられる過剰染色体 supernumerary chromosome について.

蝶類の染色体に関しては，今迄の研究者 Federley (1938), Lorkovic (1941), Valle (1948), Maeki (1953, 1959, 1976), Maeki & Remington (1960, 1961), Maeki & Ae (1966, 1968, 1969), Maeki & Ogata (1970), de Lesse (1954, 1959, 1969), Masuno & Sato (1971), Bigger (1975, 1976) 等によっ

Fig. 71. Electron-microscopic illustration of diffuse kinetochore, based on meiotic chromosome in male larva of *Eumeta variegata*. MTs located along the whole chromosome. Their ends appeared as a funnel-shaped structure (arrowed).

て，過剰染色体の存在が欧州，北米，南米，アフリカ，日本，台湾，マレーシア，ネパール，タイ各地の多数の種について報告されている．これら過剰染色体は染色体の切断 (fragmentation) により出現するものと考えられる．その理由は supernumerary chromosome として現れる染色体は通常，小形な染色体であり，その数を1個から数個増加させているのが普通である．世界各地の総計 72 種の蝶において，この過剰染色体が報告されており，これほど多数の種において出現するのは，他の生物の持っている染色体と蝶類の染色体との根本的な構造の違いによって出現するものと思われる．普通は切断によって生じた破砕染色体あるいは断片染色体と呼ばれるものは，動原体を持たないが故に，正規の染色体としての行動をとる事が出来ず，細胞質中に残されて，他の染色体と共に同じ行動をとることが出来ない．即ち細胞分裂の結果生じた娘細胞の核の中へは入ることが出来ず，細胞質中に棄てられるのが常であるが，鱗翅類の染色体が染色体上に動原体を多数所有する holokinetic chromosome であれば，切断によって生じた小さな断片染色体は動原体を持っており，63 図から 70 図にみられるように，次代の細胞の核へ，またその次の細胞の核へ入り，他の染色体と共に正規の行動をとることが出来る．上記の Federley 以来，多くの細胞遺伝学者によって調べられた過剰染色体はパラフィン法によって見出されたものであり，著者がアオスジアゲハにおいて空気乾燥法で見出した非常に小さな過剰染色体は普通のパラフィン法では検出することが困難と考えられる．それ故，空気乾燥法 (air-drying method) で鱗翅類の染色体を調べると，もっと多数の種において過剰染色体を見出すことが可能と思われる．

最近著者はアオスジアゲハの染色体におい，第二次狭窄 (secondary constriction) から切断が起り

過剰染色体を生ずる現象を確認した．即ち本種では数個の染色体が第二次狭窄を持っており，時々その付随体染色体 (satellite chromosome) が，もとの染色体から離脱して断片染色体として核板の中に現れる現象であり，今迄このような断片染色体 (fragment chromosome) は蝶類の多くの種において過剰染色体として取り扱われてきた．この蝶類にしばしば見い出される supernumerary chromosome 即ち fragment chromosome の出現は蝶類の染色体が holokinetic chromosome であるが故にみられる現象である．

以上 1—6 まで，種々の側面から鱗翅類の染色体が holokinetic chromosome であることの証拠を提出してきた．BIGGER (1975, 1976) の論文に端を発して再燃した鱗翅類の kinetochore の問題に関しては，以前に SUOMALAINEN (1965), BAUER (1967) らによって提唱された holokinetic chromosome であることは疑う余地がない．

稿を終るにあたり，筆者が蝶類染色体研究に従事して以来，30年間に亘って終始変らざる御指導と御鞭撻を戴いた恩師，北海道大学名誉教授，牧野佐二郎博士に心からの御礼を申し上げる．また，多くの御助言を戴いた Duke 大学，Sally HUGHES-SCHRADER 教授，並びに Helsinki 大学 Esko SUOMALAINEN 教授に対して厚く御礼申し上げる．電顕写真撮影については，城西歯科大学，中原皓博士に，放射線照射実験では大阪大学微生物病研究所，寺田央先生に一方ならぬ御世話になった．このお二人の先生に深く感謝の意を表する．

Summary

1. *Chromosomal features in the spermatogonial metaphase and anaphase.* The investigations have been undertaken based on the chromosomal slides prepared according to the current air-drying squash method. Chromosomes were examined in spermatogonial metaphase and early anaphase in the following 7 butterfly-species: *Papilio maackii* (2*n*, 60); *Papilio bianor* (2*n*, 60); *Polygonia c-aureum* (2*n*, 62); *Argyreus hyperbius* (2*n*, 62); *Curetis acuta* (2*n*, 58); *Favonius latifasciatus* (2*n*, 48); and *Narathura japonica* (2*n*, 48). They are reproduced in Figs. 1–12. In general, the mitotic chromosomes have been furnished as objects for the determination of chromosomal form in organisms in numerous surveys of karyological studies. As a whole, the mitotic chromosomes provide favorite materials for chromosome analysis from the following reason that the chromosomes of M–I cells are usually presented by a structure of bivalents characterized by their chiasmata.

On the basis of the chromosomal aspects derived from the mitotic metaphases observed in the above-mentioned species, the author was not able to obtain any evidence indicating that V- or J-shaped metacentric chromosomes are included in the diploid complements of the butterfly. As seen in micrographs of early anaphases shown in Figs. 7–12, every chromosome divided each into two elements which took a parallel arrangement. With the advance of the stage these sister chromatids took the start-action to each opposite pole. The chromosomal features and behavior as seen at the early anaphase were nearly identical to those observed in some Hemiptera such as *Euschistus* and *Solubea* by HUGHES-SCHRADER & SCHRADER (1961). The latter authors have described in their paper that in anaphasic disjunction the separating chromatids remain parallel to each other as they move "broadside on" to the pole.

2. *Chromosomal features and behavior in the M–I metaphase and anaphase.* The following investigations were undertaken based on the chromosome preparations according to the ordinary aceto-orcein squash method, and also phase contrast was applied for more detailed analysis. Chromosome features depicted at M–I metaphase and anaphase in the following two species: *Graphium sarpedon* (*n*, 20) (butterfly) and *Eumeta variegata* (*n*, 31) (moth), are presented in Figs. 13–25. The pre-reductional phenomenon of the bivalents in Lepidoptera had been established on the basis of the behavior of fragment chromosomes studied through the mitotic and meiotic divisions of *G. sarpedon* (MAEKI and HAYASHI, 1979). It was shown that the first division was reductional, whereas the second division was equational. Here, noteworthy was the finding that the bivalent chromosomes of Lepidoptera were constructed by "a ring of four" (LA COUR, 1952) at the M–I metaphase (Figs. 13–17, 22–23).

The general features of chromosomes of *G. sarpedon* and *E. variegata* at the M–I anaphase are remarkable by the appearance displaying "pseudo-V-shape" in outline (see Figs. 18–21, 24–25).

In the course of the first anaphase the two sister chromatids moved to the same pole, and then the two chromatids (or a half-bivalent) having the pseudo-V-shape spread gradually along a straight line from each other. It appeared that the spindle fibers attached themselves to the whole poleward surface of the two rods of each sister chromatid. This behavior followed closely the synchronized activity of their spindle fibers. Most reasonable estimation from the above observations seems to be in favor of the view that the formation of the "pseudo-V-shaped" chromosome results from the association of the two rod-shaped elements equipped with the diffuse kinetochore structure.

3. *Chromosome morphology and behavior in the M–II cells.* In the equatorial plate of M–II metaphase two sister chromatids of a rod-type appeared taking a linear arrangement in each, as seen in Fig. 26. If the chromosomes were telocentric carrying a kinetochore at their terminal ends, those two sister chromatids should be arranged in parallel condition at the M–II metaphase. Further, the dyads with the parallel arrangement would appear radially directing their kinetochores toward the cell center, as schematically shown by Oguma (1942) (Fig. 49). Every chromosome divided, however, each into two elements taking a linear arrangement at metaphase and early anaphase as seen in figs. 26–40. Under this condition each chromosomal element appeared taking a form like "a tadpole" or "the head of a writing brush" in outline (Figs. 26–31). This feature would be resulted from a bundle formation of the spindle-fibers: The fibers gather to the chromosomal part close to the cell pole, while condense longwise in another part. The above features of chromatids at the M–II metaphase would be related also to the location of centrosomes occurring in the meiosis-II stage and to the non-synchronized activity of the spindle-fibers. In the course of the second anaphase the two sister chromatids moved to the opposite poles: The anaphasic movement was found to be end-first to the pole. Then it seems probable that the chromatid being in the direction vertical to the pole may be shifted gradually to the horizontal direction. The horizontal arrangement of each monad through the anaphasic movement of the M–II chromosomes failed to be confirmed in detail in this investigation. This behavior is closely associated with the synchronized activity of their spindle-fibers.

The morphology and behavior of the M–II chromosomes in the lepidopteran species seemed to be in close coincidence to those observed in *Cimex*-species (Hemiptera) by Ueshima (1966). The situation occurring in the chromosomes at M–II metaphase and anaphase could be well understood only in the chromosomes equipped by the diffuse kinetochore structure. On the basis of the above findings it can be allowed to state that, in striking contrast to the mitotic behavior of chromosomes, the male meiosis of lepidopteran insects may be characterized by a definite restriction of kinetochore activity in the M–I and M–II chromosomes, as fairly demonstrated by Hughes-Schrader & Schrader (1961) in hemipteran species.

4. *Gamma-ray induced fragments of chromosomes in Graphium sarpedon.* The radiation treatment was made in the Radiation Laboratory through the courtesy of Mr. H. Terada, the Research Institute of Microbial Disease, Osaka University. The materials for this study consisted of over 100 male larvae of *Graphium sarpedon* at the last-instar which had been bred in the laboratory from 1974 to 1973. The condition of irradiation was as follows: Distance 75 cm; field size 12 cm × 12 cm; dosage rate 53.5 R/min; Cobalt-60 gamma irradiation unit (Shimazu). In order to induce the fragmentation of chromosomes, 50 larvae were irradiated in each year: 12 larvae in group were irradiated each at dosages of 800R, 1000R, 1500R, and 2000R. Irradiated specimens were killed at intervals of 18, 21, 24, 27, and 30 hrs after exposure. On dissection one testis from two males which were received the same dosage were prepared following the aceto-orcein squash method, while the other testis was fixed with Allen's P.F.A.-3 solution for the routine study.

On cytological examinations, the specimens treated at 1500R and 2000R showed remarkable aberrations of chromosomes at the meiotic stage. The normal haploid chromosome-number of *G. sarpedon* was 20. The nuclear plates shown in Figs. 53–54 and Fig. 60 showed 21 chromosomes at the M–I metaphase, while Fig. 59 showed 19 chromosomes in the same M–I phase. The above features resulted from the chromosomal fusion as well as from fragmentation during meiosis. Another noticeable was the feature that some of the chromosomes were being in a way ready to divide in part, as shown in Figs. 51–52 and Figs. 57–58. The chromosomes induced by the present gamma-irradia-

tion experiments were represented by two divided elements each showing an ordinary kinetic manner as seen in Figs. 55–56. The situation is suggestive of that the induced fragment chromosomes carry the kinetochore in each.

5. *Behavior of a fragment chromosome in Graphium sarpedon.* The author had an opportunity to find a supernumerary chromosome represented by a fragment in a larva of *G. sarpedon* bred in the laboratory in 1975. The supernumerary element occurred without exception in all nuclei of the spermatogonial cells (Figs. 63–64). It seems apparent that the fragment may be produced by chromosome fragmentation which had taken place in certain early periods of spermatogonial proliferation. All nuclei at M–I always contained the element of the same nature (Figs. 65–67), while there were two kinds of the M–II nuclei, one carrying the supernumerary and another having no such element in a proportion of 1:1 (Figs. 69–70). The fragment chromosome divided in *n*, 21 nuclei into two elements: this picture was well illustrated in Figs. 68 and 69. Thus, the evidence is indicative of that *G. sarpedon* is a species belonging to the pre-reduction group at meiosis. The fragment chromosome behaved in a quite regular manner during the whole course of both mitotic and meiotic divisions as shown in Figs. 63–70. The above findings are strongly suggestive of that the fragment chromosome carries the kinetochore or centromere. General recognition available to us is that the chromosomes of lepidopteran insects are characterized by the holokinetic organization in general; it has been expected early in relation to genetic information in Lepidoptera.

The supernumerary chromosomes have been known to occur in as many as 72 species of Lepidoptera which belong to Hesperiidae, Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae, Danaidae, Heliconidae, Satyridae, and Lycaenidae, as provided in comprehensive studies carried out by FEDERLEY (1938), LORKOVIC (1941), VALLE (1948), MAEKI (1953, 1959, 1976), MAEKI & REMINGTON (1960, 1961), MAEKI & AE (1966, 1968, 1969), MAEKI & OGATA (1970), DE LESSE (1954, 1959, 1969), MASUNO & SATO (1971), and BIGGER (1976). In many cases their mitotic behavior has been shown to follow a usual manner. These findings constitute a strong basis, or serve as supplementary evidence, for the real occurrence of the holokinetic structure of the lepidopteran chromosomes. In quite recently the author chanced to observe the supernumerary chromosome due to fragmentation occurred at the site of the secondary constriction in *G. sarpedon*. It has been known that the connection of the satellite chromosome is frequently cut at a site of the secondary constriction. Referring to the above-mentioned features of the supernumerary chromosomes in Lepidoptera, the following statements can be allowed that several chromosomes having secondary constrictions in lepidopteran species tend to readily detach the satellite from the rest. It seems very probable that elements designated as supernumerary chromosomes in many species of Lepidoptera may correspond to those of such origin.

6. *Electron microscopy of the microtubules (MTs) locating along the chromosomes of Eumeta variegata.* The larvae of *E. variegata* obtained at Nishinomiya in October, 1975 were selected as material on account of the large number and small size of chromosomes, since their chromosomes provide favorite subjects for electron microscopic analysis. The testis was fixed in collidin buffered glutaraldehyde solution (5%) for six hours, and finally fixed in collidin buffered OsO_4 (2%) for one hour. The materials embedded in Epon 812, and all sections were contrasted by the usual way with uranyl acetate and lead citrate.

BAJER & MOLE-BAJER (1972) have described the nature of kinetochore as follows: The kinetochores in higher animals having monokinetic chromosomes are generally composed of at least three zones; an inner zone adjacent to the chromosomal body, outer denser zones, and a lighter zone between. The outer dense zone often has lighter diffuse material facing the spindle. The microtubules (MTs) are embedded in the outer dense layers or in all three layers. Diffuse kinetochores most likely have a somewhat different structure. A remarkably important pattern, without an external layer of denser material, has been found in *Luzula* mitosis (LAMBERT, 1971). MTs are located along the whole length of the chromosome and occasionally very uniformly spaced. The present author had a chance to observe a quite similar pattern of MTs in the M–I metaphase chromosomes of *E. variegata*: The MTs were found located along the whole length of the chromosome as seen in Fig. 71. The MTs appeared as a funnel-shaped structure at the ends of MTs, as demonstrated in *Luzula albida* by LAMBERT (1971). This may serve as further or supplementary evidence for the holokinetic structure of lepidopteran chromosomes.

In the present paper, the author presented some evidence for the occurrence of holokinetic chro-

mosomes in lepidopteran insects, on the bases of the data derived from the author's own studies on chromosomal features and behavior in mitotic and meiotic-I cells; in meiotic-II and in ^{60}Co-treated cells; in fragment chromosomes appeared spontaneously; and in electron microscopic investigations of the MTs locating along the chromosomes. The data rendered it possible to conclude that there is no slight doubt in stating that the chromosomes of lepidopteran insects are characterized by the holokinetic organization equipped with the diffuse kinetochores.

文　　献

BAJER, A. S. & J. MOLÉ-BAJER, 1972. Spindle Dynamics and Chromosome Movements. *Internatn. Rev. Cytol.*, (Suppl. 3), 271 pp. Academic Press, New York.

BAUER, H., 1967. Die kinetische Organisation der Lepidopteren-Chromosomen. *Chromosoma*, **22**: 101–125.

BIGGER, T. R. L., 1975. Karyotypes of some Lepidoptera chromosomes and changes in their holokinetic organisation as revealed by new cytological techniques. *Cytologia*, **40**: 713–726.

——— 1976. Karyotypes of three species of Lepidoptera including an investigation of B-chromosomes in *Pieris*. *Ibid.*, **41**: 261–282.

DE LESSE, H., 1960. Spéciation et variation chromosomique chez les Lépidoptères Rhopalocères. *Ann. Sci. Nat. Zool.*, (12), **2**: 1–223.

——— 1967. Les nombres de chromosomes chez les Lépidoptères Rhopalocères néotropicaux. *Ann. Soc. ent. Fr.* (N. S.), **3**: 67–136.

FEDARLEY, H., 1938. Chromosomenzahlen Finnländischer Lepidopteren. I. Rhopalocera. *Hereditas*, **24**: 221–269.

——— 1945. Die Konjugation der Chromosomen bei den Lepidopteren. *Soc. Sci. Fenn. Comment. Biol.*, **9** (13): 1–12.

HUGHES-SCHRADER, S. & F. SCHRADER, 1961. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma*, **12**: 327–350.

KUSANAGI, A., 1973. Preferential orientation of interchange multiples in *Luzula elegans*. *Jap. J. Genet.*, **48**: 175–183.

LA COUR, L. F., 1952. The *Luzula* system analyzed by X-rays. *Heredity*, **6**, (Suppl.): 77–81.

LORKOVIĆ, Z., 1941. Die Chromosomenzahlen in der Spermatogenese der Tagfalter. *Chromosoma*, **2**: 155–191.

MAEKI, K., 1953. Cytological studies of some Japanese butterflies (Lepidoptera-Rhopalocera). *Ann. Stud. Kwansei Gakuin Univ.*, **1**: 67–70.

——— 1958. On the cytotaxonomical relationship in *Leptidea* (Lepidoptera-Rhopalocera). *Jap. J. Genet.* **33**: 283–285.

——— & M. HAYASHI, 1979. On the behavior of a supernumerary chromosome observed in *Graphium sarpedon* (Lepidoptera, Papilionidae). *Chromosome Inform. Ser.*, **27**: 9–10.

——— & C. L. REMINGTON, 1960a. Studies of the chromosomes of North American Rhopalocera. I. Papilionidae. *J. lepid. Soc.* **13**: 193–203.

——— 1960b. Studies of the chromosomes of North American Rhopalocera. II. Hesperiidae, Megathymidae, and Pieridae. *Ibid.*, **14**: 37–57.

——— 1961a. Studies of the chromosomes of North American Rhopalocera. III. Lycaenidae, Danaidae, Satyrinae, Morphinae. *Ibid.*, **14**: 127–147.

——— 1961b. Studies of the chromosomes of North American Rhopalocera. IV. Nymphalidae, Charaxidinae, Libytheinae. *Ibid.*, **14**: 179–201.

MAKINO, S., 1956. A Review of the Chromosome Number in Animals. Rev. ed., 300 pp. Hokuryukan, Tokyo.

OGUMA, K., 1942. Observations de formis compositionibusque chromosomatum et de dispositionibus eorum in tempore divisionis atque propositio aliquorum novorum terminorum. *Jap. J. Genet.*, **18**: 205–216.

SCHRADER, F., 1940. The formation of tetrads and the meiotic mitoses in the male of *Rhytidolomia senilis* SAY (Hemiptera, Heteroptera). *J. Morph.* **67**: 123–142.

SCHRADER, F., 1947. The role of the kinetochore in the chromosomal evolution of the Heteroptera and Homoptera. *Evolution*, **1**: 134–142.

SUOMALAINEN, E., 1953. The kinetochore and the bivalent structure in the Lepidoptera. *Hereditas*, **39**: 88–96.

——— 1965. On the chromosomes of the geometrid moth genus *Cidaria*. *Chromosoma*, **16**: 166–184.

——— & O. HALKKA, 1963. The mode of meiosis in the Psyllina. *Ibid.*, **14**: 498–510.

UESHIMA, N., 1963. Chromosome behavior of the *Cimex pilosellus* complex (Cimicidae, Hemiptera). *Ibid.*, **14**: 511–521.

——— 1979. Animal Cytogenetics. Vol. 3. Insecta 6, Hemiptera II. 117 pp. Gebruder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.

WHITE, M. J. D., 1973. Animal Cytology and Evolution. 3rd ed., 961 pp. Cambridge Univ. Press, London.

——— 1978. Modes of Speciation. 455 pp. W. H. Freeman and Co., San Francisco.